

DT05 Rec'd PCT/PTO 18 OCT 2004

DOCKET NO.: 260068US0PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Yoshihiro HAKAMADA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/05371

INTERNATIONAL FILING DATE: April 25, 2003

FOR: MUTATED ALKALINE CELLULASE

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

**COUNTRY**

Japan

**APPLICATION NO**

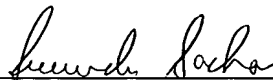
2002-124474

**DAY/MONTH/YEAR**

25 April 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/05371. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number

**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/05371

25.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 4月25日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-124474

[ ST.10/C ]:

[ JP 2002-124474 ]

出 願 人

Applicant(s):

花王株式会社

REC'D 20 JUN 2003

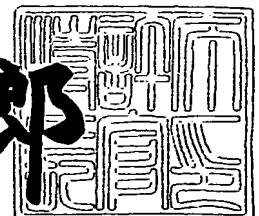
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3041481

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01991404

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/50

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 袴田 佳宏

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 小澤 忠弘

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 小林 徹

【特許出願人】

【識別番号】 000000918

【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000084

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

【代表者】 有賀 三幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 164232

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異アルカリセルラーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列又はこれと 9 0 % 以上の相同性を有するセルラーゼについて、配列番号 1 の 3 4 3 位～3 7 7 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる 1 以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数 2 ～1 5 のペプチド残基を挿入した変異アルカリセルラーゼ。

【請求項 2】 配列番号 1 の 3 5 7 位～3 6 2 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる 1 以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数 2 ～5 のペプチド残基を挿入した請求項 1 記載の変異アルカリセルラーゼ。

【請求項 3】 配列番号 1 の 3 5 7 位～3 6 2 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基を全て欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数 3 のペプチド残基を挿入した請求項 1 又は 2 記載の変異アルカリセルラーゼ。

【請求項 4】 挿入するペプチド残基が、アラニン及びグリシン、アラニン及びヒスチジン、又はアラニン及びアルギニンのいずれかを構成アミノ酸残基として含むものである請求項 1 ～3 のいずれか 1 項記載の変異アルカリセルラーゼ。

【請求項 5】 挿入するペプチド残基が、アラニン－グリシン－アラニン、アラニン－ヒスチジン－アラニン又はアラニン－アルギニン－アラニンである請求項 1 ～4 のいずれか 1 項記載の変異アルカリセルラーゼ。

【請求項 6】 請求項 1 ～5 記載の変異アルカリセルラーゼをコードする遺伝子。

【請求項 7】 請求項 6 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 8】 請求項 7 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 9】 宿主が微生物である請求項 8 記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は衣料用洗剤等に配合可能な変異アルカリセルラーゼに関する。

## 【0002】

## 【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

衣料用洗剤使用時における洗濯液中のpHは、殆どがpH10～11までのアルカリ性領域にある。従って、衣料用洗剤に配合される酵素は、アルカリ性至適で且つアルカリ性環境下で安定なものが要求されてきた。

## 【0003】

従来、衣料用洗剤等に配合可能なアルカリセルラーゼとしては、Bacillus 属に属する Bacillus sp. KSM-635由来のアルカリセルラーゼ（特公昭60-23158号公報、特公平6-030578号公報、米国特許第4945053号明細書等）、Bacillus sp. KSM-64由来のアルカリセルラーゼ（Shikata et al. Agric.Biol.Chem., 54, 91-96, 1990、Sumitomo et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 872-877, 1992）、中温性の好アルカリ性菌 Bacillus sp. KSM-S237（FERM-BP7875）により生産される耐熱性アルカリセルラーゼ（特開平10-313859号公報）、Bacillus sp. KSM-N257由来のアルカリセルラーゼ（特願平12-281378号）、Bacillus sp. KSM-N131由来のアルカリセルラーゼ（特願平12-373859号）等が知られているが、これらはカルボキシメチルセルロース（CMC）を基質とした場合の最適反応pHがいずれも9付近であり、洗濯に対して最適なpHを有するものではない。

## 【0004】

一方、糖質分解酵素において、その最適反応pHを変化させるという研究としては、好アルカリ性 Bacillus 由来のアルカリセルラーゼ（NK1）と Bacillus subtilis 由来の中性セルラーゼ（BSC）のキメラタンパク質を構築し、そのpH特性を変化させた例が報告されているが、これは、最適pHをアルカリ性から中性にシフトさせたものである（Park et al., Protein Eng., 6, 921-926, 1993）。

## 【0005】

また最近では、Trichoderma reesei 由来のセロビオヒドロ

ラーゼ (Ce 17A) に関し、その活性中心近傍のアミノ酸を置換することで、野生型と比較してより最適 pH を上昇させた報告がなされているが (Beker et al, Biochem. J., 356, 19-31, 2001)、これは野生型酵素の最適 pH が酸性領域にあり、その変異体の最適 pH は 1 pH ユニット以内の上昇にすぎない。

このように、糖質分解酵素においては、その最適反応 pH をアルカリ性側にシフトさせた報告例は殆ど無いのが実情である。

#### 【0006】

本発明は、アルカリセルラーゼの遺伝子を改変することによって、洗剤用酵素として最適の pH を有する変異アルカリセルラーゼを提供することを目的とする。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、配列番号 1 に示すアルカリセルラーゼ (Eg 1-237) について、その活性ドメインを中心に立体構造を予測し、部位特異的変異法により種々の変異を導入することにより目的の酵素を探索した結果、ループ構造の一部を構成する特定領域のアミノ酸残基を欠失させ、当該部位に新たなペプチド残基を挿入することで、CMC 分解活性における最適反応 pH を上昇できることを見出した。

#### 【0008】

すなわち本発明は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列又はこれと 90% 以上の相同性を有するセルラーゼについて、配列番号 1 の 343 位～377 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる 1 以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数 2～15 のペプチド残基を挿入した変異アルカリセルラーゼ、及びそれをコードする遺伝子を提供するものである。

#### 【0009】

また本発明は、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換体を提供するものである。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の変異アルカリセルラーゼは、配列番号1で示されるアミノ酸配列又はこれと90%以上の相同性を有するセルラーゼを変異の対象となるセルラーゼ（以下、「親アルカリセルラーゼ」ともいう）とし、当該配列番号1の343位～377位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる1以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数2～15のペプチド残基を挿入してなるものであり、これらは野生型の変異体或いは人為的に変異を施した変異体であってもよい。

#### 【0011】

ここで、親アルカリセルラーゼである配列番号1に示すアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するセルラーゼとしては、当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を示すものがより好ましく、98%以上の相同性を示すものがさらに好ましく、これらは野生型又は野生型の変異体であってもよい。尚、アミノ酸配列の相同性はGENETYX-WINのマキシマムマッチングやサーチホモロジー等のプログラム（ソフトウェア開発）を用いて計算することができる。

#### 【0012】

また、斯かる配列番号1で示されるアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するセルラーゼは、ホモロジーモデリングの手法を用い、3D-1D、XPLORE及びPROCHECKプログラムによりセルラーゼの分子構造を予測した場合に、配列番号1において42番目のロイシンから404番目のバリンまでの活性ドメイン領域と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性を有し、且つ配列番号1における343番目のアスパラギンから377番目のロイシンに相当するアミノ酸配列がセルラーゼ分子内においてループ構造を有しているものが好ましい。尚、この場合のアミノ酸配列の相同性は、例えばLipman-Pearson法（Science, 227, 1435, 1985）等に準じて計算することができる。

#### 【0013】

また親アルカリセルラーゼは、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）法あるいはゲル濾過法により得られる分子量が



86, 000 $\pm$ 2, 000である、カルボキシメチルセルロースを基質とした場合の最適反応pHが7.5~9.0の間にある、最適反応温度が40~50℃の範囲にある、等の性質を有しているのが好ましく、更にカルボキシメチルセルロースのほかにリケナンを良好に分解することが好ましく、pH9で50℃、10分間の処理においても十分に安定であることが好ましい。

特に、分子量が86, 000 $\pm$ 2, 000 (SDS-PAGEあるいはSephacryl S200カラムによるゲル濾過法)、最適反応pHが8.6~9.0、最適反応温度が50℃、カルボキシメチルセルロースのほかにリケナンを良好に分解し、pH9、5mM塩化カルシウム存在下で50℃、10分間の処理を行った場合95%以上(30℃、10分間処理時の残存活性を100%とする)の残存活性を認めるような性質を有するものが好ましい。

#### 【0014】

以上より、本発明における親アルカリセルラーゼとしては、配列番号1に示すアルカリセルラーゼの他、上記段落【0012】で示したアミノ酸配列上の特徴を有するもの及び／又は段落【0013】で示した酵素学的性質を有するもの、特に段落【0012】で示したアミノ酸配列上の特徴を有し且つ段落【0013】で示した酵素学的性質を有するものであり、配列番号1に示すアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を示すものが好ましい。

#### 【0015】

具体的には、「配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するアルカリセルラーゼ」であるEg1-237 [バチルス エスピー KSM-S237 (FERMBP-7875) 由来、Hakamadaら, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2281-2289, 2000]、バチルス エスピー 1139株由来のアルカリセルラーゼ (Eg1-1139) (Fukumori ら, J. Gen. Microbiol, 132, 2329-2335) (相同性91.4%)、バチルス エスピー KSM-64株由来のアルカリセルラーゼ (Eg1-64) (Sumitomo ら, Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 872-877, 1992) (相同性91.9%)、バチルス エスピー KSM-N131株由来のセルラーゼ (Eg1-N131b) (特願2000-47237号) (相

同性95.0%)等が挙げられる。

【0016】

本発明の変異アルカリセルラーゼは、上記親アルカリセルラーゼにおいて、配列番号1の343位～377位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる1以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数2～15のペプチド残基を挿入してなるものである。

欠失させるアミノ酸残基は、配列番号1の343位～377位における任意の連続又は非連続の1～35個のアミノ酸残基であればよく、好ましくは350位～377位中、より好ましくは355位～365位中、更に好ましくは357位～362位中のアミノ酸残基である。

特に、343位～377位中の任意の1～27残基、2～15残基又は3～10残基、355位～377位中の任意の1～8残基、3～6残基又は全てのアミノ酸残基、357位～362位中の任意の2残基、2～5残基又は全てのアミノ酸残基が好ましい。

【0017】

斯かる配列番号1の343位～377位のアミノ酸領域は、ホモロジーモデリングによる立体構造解析 (Ozawa et al., Protein Eng., 14, 501-504, 2001) によれば、Eg1-237の活性中心から比較的離れた位置に存在し、自由度が高く、且つセルラーゼ構造の維持に深く関与していると考えられるループ構造の一部を形成する領域であると推定される。

【0018】

尚、「配列番号1の343位～377位に相当する位置のアミノ酸残基」を特定する方法としては、例えばリップマン-パーソン法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較し、各アルカリセルラーゼのアミノ酸配列中に存在する保存アミノ酸残基に最大の相同性を与えることにより行うことができる。セルラーゼのアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、アミノ酸配列中にある挿入、欠失にかかわらず、相同アミノ酸残基の各セルラーゼにおける配列中の位置を決めることが可能である (図1)。相同位置は、三次元構造中で同一位置に存在すると考えられ、対象のセルラーゼの特異的機能に関して類似した効

果を有することが推定できる。

例えば、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するアルカリセルラーゼ (E g l - 2 3 7) の 3 5 7 位 ~ 3 6 2 位に相当する位置を、前述した E g l - 1 1 3 9、E g l - 6 4、E g l - N 1 3 1 b について示せば、下記表 1 のとおりである。

【 0 0 1 9 】

【表 1】

Egl-237	Egl-1139	Egl-64	Egl-N131b
357Gly	357Gly	357Gly	343Gly
358Lys	358Lys	358Lys	344Lys
359Ser	359Ser	359Ser	345Ser
360Asn	360Asn	360Asn	346Asn
361Ala	361Ala	361Ala	347Ala
362Thr	362Thr	362Thr	348Thr

【 0 0 2 0 】

斯かる欠失部位に挿入すべきペプチド残基としては、20種類の必須アミノ酸のいずれから構成されていてもよいが、アラニン、グリシン、ヒスチジン、アルギニンを含むものが好ましく、特にアラニンとグリシン、アラニンとヒスチジン、アラニンとアルギニンを含むものが好ましい。

また、ペプチド残基を構成するアミノ酸残基の数としては、2~15個であるのが好ましく、酵素活性の点から、2~10個、更には2~6個であるのが好ましく、特に3個であるのが好ましい。

【 0 0 2 1 】

斯かるペプチド残基の好適な例としては、例えばアスパラギン-スレオニン-アラニン-バリン-グリシン-イソロイシン、アラニン-セリン-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン-グルタミン酸、システイン-ロイシン-グリシン-ヒスチジン-セリン、チロシン-グルタミン-リジン-アラニン-アラニン、アスパラギン酸-メチオニン-イソロイシン-バリン、イソロイシン-スレオニ

ン-プロリン-リジン、グリシン-ロイシン-システイン、セリン-バリン-フェニルアラニンが挙げられるが、中でも両末端にアラニン残基を有する3～6残基のペプチド残基が好ましく、アラニン-任意の1個のアミノ酸-アラニンがより好ましく、アラニン-グリシン-アラニン、アラニン-ヒスチジン-アラニン又はアラニン-アルギニン-アラニンが特に好ましい。

## 【 0 0 2 2 】

また、本発明の変異アルカリセルラーゼには、アルカリセルラーゼ活性並びに改変された特性を失わない限り、上記の変異とは別に、アミノ酸配列中において1～数個のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されたものも包含する。

## 【 0 0 2 3 】

本発明の変異アルカリセルラーゼは、親アルカリセルラーゼに対し目的の変異を導入すればよく、例えば以下の方法により行われる。

すなわち、親アルカリセルラーゼを培養して得られた培養液から遠心分離により菌体を分離し、該菌体からのアルカリセルラーゼ遺伝子を含んだ染色体DNAを調製〔例えば、マーマーの方法 (J.Mol.Biol., 3, 208-212, 1961) や斎藤と三浦の方法 (Biochim.Biophys.Acta, 72, 619-629, 1963) 〕し、ショットガンクローニング法やPCR法を用いて親アルカリセルラーゼ（例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するアルカリセルラーゼ）をコードする遺伝子（配列番号2）をクローニングすることができる。クローニングされた遺伝子に対し変異を導入し、変異遺伝子を含むプラスミドを用いて適当な宿主菌を形質転換し、形質転換株を培養することによってその培養物から本発明の変異アルカリセルラーゼを得ることができる。

## 【 0 0 2 4 】

親アルカリセルラーゼをコードする遺伝子に変異を導入する方法としては、部位特異的変異法等を用いることができる。例えばTakara社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Km kit等を使用することができる。変異が導入されたアルカリセルラーゼ遺伝子は適当なベクターに組込むことができる。

## 【 0 0 2 5 】

ここで使用可能なベクターとしては、宿主菌内で複製維持可能であり、アルカリセルラーゼ遺伝子を発現させることができ、組込まれた該遺伝子を安定に保持できれば如何なるものも使用可能である。例えば、Bacillus 属細菌を宿主とする場合、pUB110やpHY300PLK等が挙げられ、大腸菌を宿主とする場合、pUC18、pUC19、pBR322或いはpHY300PLK等が挙げられる。

## 【0026】

かくして得られた組換えベクターを用いて宿主菌を形質転換するにはプロトプラスト法、コンピテントセル法、エレクトロポレーション法等を用いて行うことができる。宿主菌としては特に制限されないがBacillus 属（枯草菌）等のグラム陽性菌、Escherichia coli（大腸菌）等のグラム陰性菌、Streptomyces 属（放線菌）、Saccharomyces 属（酵母）、Aspergillus 属（カビ）等の真菌が挙げられる。

## 【0027】

得られた形質転換体は、資化しうる炭素源、窒素源、金属塩、ビタミン等を含む培地を用いて適当な条件下で培養すればよい。かくして得られた培養液から、一般的な方法によって酵素の分取や精製を行い、凍結乾燥、噴霧乾燥、結晶化により必要な酵素形態を得ることができる。

## 【0028】

かくして得られる変異アルカリセルラーゼの最適反応pHは、親アルカリセルラーゼの値よりも高く、好ましくは、pH9.0～9.5、より好ましくはpH9.5～10.0まで高アルカリ側にシフトしているものである。さらに変異アルカリセルラーゼの最適反応pH以外の諸性質は、段落【0013】に示した親アルカリセルラーゼの諸性質を保持していることが好ましい。

## 【0029】

## 【実施例】

## 実施例1 Eg1-237のループ領域の改変

Eg1-237の分子モデルは、既に結晶構造が解析されているCelKの解析データを基にホモロジーモデリングにより構築し、モデル構造の精密化は、3

D-1D、XPLORE及びPROCHECKプログラムにより行った。次いで、得られた情報を基にループ構造内の一部のアミノ酸（357番グリシンから362番スレオニン）を欠失させると同時にアラニン-グリシン-アラニン、アラニン-ヒスチジン-アラニン及びアラニン-アルギニン-アラニンを新たに導入した。このループ領域の変異には、それぞれ変異導入プライマー1、2及び3（配列番号3、4及び5）を用い、アンチセンスプライマーには変異導入プライマー4（配列番号6）を用いた。アラニン-グリシン-アラニン変異導入においては鋳型DNAとしてpHY300PLK中に組換えられたEg1-237遺伝子を用いた。アラニン-ヒスチジン-アラニン及びアラニン-アルギニン-アラニン変異導入には鋳型DNAにpHY300PLK中に組換えられたアラニン-グリシン-アラニン変異体プラスミドを用いた。具体的には、鋳型DNAプラスミド0.5  $\mu$ L (10 ng)、変異導入用プライマー20  $\mu$ L (1  $\mu$ M)、アンチセンスプライマー20  $\mu$ L (1  $\mu$ M)、10倍濃度のPCR用緩衝液10  $\mu$ L、10 mM デオキシヌクレオチド3リン酸(dNTP)混液8  $\mu$ L、Pyrobest DNAポリメラーゼ0.5  $\mu$ L (2.5 units、タカラ)及び脱イオン水39.5  $\mu$ Lを混合した後、gene amp PCR system9700（アマシャムファルマシア）でPCRを行った。反応条件は、94℃2分間の熱変性後、94℃1分間、60℃1分間、72℃1.5分間（30サイクル）及び72℃3分間で行った。得られたPCR産物をGFX PCR DNA and gel band purification kit（アマシャムファルマシア）で精製後（43.5  $\mu$ L）、5.5  $\mu$ Lの10倍濃度のリン酸化用緩衝液及びpoly nucleotide kinase 1  $\mu$ L (10 units)を加え、37℃で1時間リン酸化反応を行った後、精製した。リン酸化されたPCR産物25  $\mu$ Lに、鋳型プラスミドを2  $\mu$ L (20 ng)、10倍濃度のPCR用緩衝液10  $\mu$ L、10 mM dNTP混液8  $\mu$ L、Pyrobest DNAポリメラーゼ1  $\mu$ L (5 units)及び脱イオン水54  $\mu$ Lを混合した後、PCRを行った。反応条件は、94℃2分間の熱変性後、94℃1分間、58℃1分間、72℃6分間（30サイクル）及び72℃12分間で行った。得られたPCR産物を精製後（43.5  $\mu$ L）、5.5  $\mu$ Lの10倍濃度のリン酸化用緩衝液及びポリヌクレ

オチドキナーゼ  $1\ \mu\text{L}$  ( $10\ \text{units}$ ) を加え、 $37^\circ\text{C}$  で1時間リン酸化反応を行った。エタノール沈澱により回収された  $10\ \mu\text{L}$  のDNA溶液を *ligation kit ver. 2* (タカラ) を用いて  $16^\circ\text{C}$  で18時間ライゲーション反応を行い、自己閉環した後、再度エタノール沈澱によりDNA混液を回収した。

【0030】

## 実施例2 形質転換法

実施例1で得られたDNA混液  $5\ \mu\text{L}$  を用いて *Bacillus subtilis* ISW1214株に導入して形質転換体を取得した (Chang and Cohen, Mol. Gen. Gent., 168, 111, 1979)。この方法により得られたプロトプラストをテトラサイクリン ( $15\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、シグマ) を含むDM3再生寒天培地 [ $0.8\%$  (w/v) 寒天 (和光純薬)、 $0.3\text{M}$  コハク酸二ナトリウム6水和物、 $0.5\%$  カザミソ酸テクニカル (ディフコ)、 $0.5\%$  酵母エキス、 $0.35\%$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.15\%$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.5\%$  グルコース、 $0.4\%$   $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.01\%$  牛血清アルブミン (シグマ)、 $0.5\%$  CM C (関東科学)、 $0.005\%$  トリパンプルー (メルク) 及びアミノ酸混液 (ロイシン、メチオニン  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )] 上に塗抹し、 $30^\circ\text{C}$  で72時間培養して形質転換体を得た。DM3再生寒天平板培地上で、ハローを形成した形質転換体をテトラサイクリン ( $15\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含んだポリペプトン培地 ( $3\%$  ポリペプトンS、 $3\%$  マルトース、 $0.5\%$  魚肉エキス (和光純薬)、 $0.1\%$  酵母エキス、 $0.1\%$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.02\%$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) で、 $30^\circ\text{C}$ 、15時間振とう培養を行い、集菌後、micro prep plasmid purification kit (アマシャムファルマシア) によりプラスミドを回収、精製した。取得したプラスミド中に挿入されたセルラーゼ遺伝子の変異配列の確認は、377 DNAシーケンサー (アプライドバイオシステム) を用いて行なった。変異導入近辺の領域を解読できるような適当なシーケンス用プライマーを用いて塩基配列解析を行い、目的の変異が導入されているプラスミドを選別した。

【0031】

## 実施例3 セルラーゼ変異体の生産

宿主菌 B. subtilis ISW1214 株の培養は、3% ポリペプトン S (日本製薬製)、0.5% 魚肉エキス、0.05% 酵母エキス、0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、テトラサイクリン ( $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及び 5% マルトースを含んだ培地を用いて、30℃で72時間行った。

各種変異体を培養した結果、ループ領域変異体アラニン-グリシン-アラニンのセルラーゼ活性量は  $36800 \text{ U}/\text{L}$ 、アラニン-ヒスチジン-アラニンの活性量は  $34700 \text{ U}/\text{L}$  及びアラニン-アルギニン-アラニンの活性量は  $32400 \text{ U}/\text{L}$  であった。

#### 【0032】

尚、セルラーゼ活性は、3, 5-ジニトロサリチル酸 (DNS) 法により測定した。

即ち、0.2 mL の 0.5 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.0)、0.4 mL の 2.5% (w/v) カルボキシメチルセルロース (A01MC; 日本製紙)、0.3 mL の脱イオン水から成る反応液に 0.1 mL の適当に希釈した酵素液を加え 40℃、20 分間反応させた後、1 mL のジニトロサリチル酸試薬 (0.5% ジニトロサリチル酸、30% ロッセル塩、1.6% 水酸化ナトリウム水溶液) を添加し、沸水中で 5 分間還元糖の発色を行った。氷水中で急冷し、4 mL の脱イオン水を加え 535 nm における吸光度を測定し還元糖の生成量を求めた。ブランクは酵素液を加えずに処理した反応液にジニトロサリチル酸試薬を加えた後、酵素液を添加し、同様に発色させたものを用意した。酵素 1 単位 (1 U) は、上記反応条件下において 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  のグルコース相当の還元糖を生成する量とした。

#### 【0033】

#### 実施例 4 組換えセルラーゼループ改変体の精製

組換えセルラーゼループ改変体の培養上清液を脱イオン水にて 10 倍に希釈した後、予め、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した DEAE トヨパール (東ソー) カラム ( $2.5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ ) に添着した。同緩衝液でカラムを洗浄した後、同緩衝液中 0~0.4 M の塩化ナトリウム  $400 \text{ mL}$  による



直線濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。目的の組換えセルラーゼループ改変体は、塩化ナトリウム濃度 0.25 M 付近で、電気泳動的にほぼ単一な成分として溶出された。脱塩濃縮は、限外濾過膜 (PM10、ミリポア) を用いて行った。

## 【 0 0 3 4 】

## 実施例 5 組換えセルラーゼループ改変体の最適反応 pH

実施例 4 の如く調製して得られた組換えセルラーゼループ改変体の精製標品を用いて、最適反応 pH を調べた。グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.2 ~ 10.9) を用いて最適反応 pH を調べた結果、組換え野生型セルラーゼの最適反応 pH は、pH 9.0 であるのに対し、アラニン-グリシン-アラニン変異体のセルラーゼの最適反応 pH は、pH 10 と 1 pH ユニット高アルカリ性側にシフトすることが判った (図 1)。また、アラニン-ヒスチジン-アラニン変異体及びアラニン-アルギニン-アラニン変異体の最適反応 pH は、9.6 付近であり、さらに pH 8.8 から pH 9.9 の活性は最適 pH 9.6 での活性を 100% とした場合、相対値 95% 以上と親セルラーゼやアラニン-グリシン-アラニン変異体に比べ高くなっていることも判った (図 2、3)。

## 【 0 0 3 5 】

## 【発明の効果】

本発明の変異アルカリセルラーゼは、洗濯液中の pH (pH 10.5 付近) に近い最適 pH を有し、洗剤用酵素として有用である。

## 【 0 0 3 6 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Mutant alkali Cellulase

<130> P01991404

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 824

&lt;212&gt; PRT

<213> Bacillus sp.KSM-S237

&lt;400&gt;-1

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly

20 25 30

Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val

35 40 45

Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly

50 55 60

Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly

65 70 75 80

Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn

85 90 95

Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu

100 105 110

Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile

115 120 125

Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met

130 135 140

Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp

145	150	155	160
Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu			
	165	170	175
Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser			
	180	185	190
Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp			
	195	200	205
Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys			
	210	215	220
Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp			
225	230	235	240
Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His			
	245	250	255
Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr			
	260	265	270
Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met			
	275	280	285
Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr			
	290	295	300
Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp			
305	310	315	320
Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp			
	325	330	335
Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr			
	340	345	350
Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro			
	355	360	365
Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val			
	370	375	380

Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe  
 405 410 415  
 Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn  
 420 425 430  
 Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val  
 435 440 445  
 Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp  
 450 455 460  
 Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val  
 465 470 475 480  
 Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser  
 485 490 495  
 Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala  
 500 505 510  
 Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr  
 515 520 525  
 Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu  
 530 535 540  
 Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val  
 565 570 575  
 Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser  
 580 585 590  
 Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser  
 595 600 605  
 Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala

610	615	620
Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp		
625	630	635
Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly		640
645	650	655
Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala		
660	665	670
Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn		
675	680	685
Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu		
690	695	700
Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys		
705	710	715
Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg		720
725	730	735
Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg		
740	745	750
Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro		
755	760	765
Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp		
770	775	780
Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys		
785	790	795
Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala		800
805	810	815
Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys		
820		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2475

&lt;212&gt; DNA

<213> Bacillus sp.KSM-S237

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2475)

&lt;400&gt; 2

atg atg tta aga aag aaa aca aag cag ttg att tct tcc att ctt att 48

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile

1

5

10

15

tta gtt tta ctt cta tct tta ttt ccg gca gct ctt gca gca gaa gga 96

Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly

20

25

30

aac act cgt gaa gac aat ttt aaa cat tta tta ggt aat gac aat gtt 144

Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val

35

40

45

aaa cgc cct tct gag gct ggc gca tta caa tta caa gaa gtc gat gga 192

Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly

50

55

60

caa atg aca tta gta gat caa cat gga gaa aaa att caa tta cgt gga 240

Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly

65

70

75

80

atg agt aca cac gga tta cag tgg ttt cct gag atc ttg aat gat aac 288

Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn

85

90

95

gca tac aaa gct ctt tct aac gat tgg gat tcc aat atg att cgt ctt 336

Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu

100

105

110

gct atg tat gta ggt gaa aat ggg tac gct aca aac cct gag tta atc 384

Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile

115

120

125

aaa caa aga gtg att gat gga att gag tta gcg att gaa aat gac atg 432

Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met

130

135

140

tat gtt att gtt gac tgg cat gtt cat gcg cca ggt gat cct aga gat 480

Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp

145

150

155

160

cct gtt tat gca ggt gct aaa gat ttc ttt aga gaa att gca gct tta 528

Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu

165

170

175

tac cct aat aat cca cac att att tat gag tta gcg aat gag ccg agt 576

Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser

180

185

190

agt aat aat aat ggt gga gca ggg att ccg aat aac gaa gaa ggt tgg 624

Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp

195

200

205

aaa gcg gta aaa gaa tat gct gat cca att gta gaa atg tta cgt aaa 672

Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys

210

215

220

agc ggt aat gca gat gac aac att atc att gtt ggt agt cca aac tgg 720

Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp

225

230

235

240

agt cag cgt ccg gac tta gca gct gat aat cca att gat gat cac cat 768

Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His

245

250

255

aca atg tat act gtt cac ttc tac act ggt tca cat gct gct tca act 816

Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr

260

265

270

gaa agc tat ccg tct gaa act cct aac tct gaa aga gga aac gta atg 864

Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met

275

280

285

agt aac act cgt tat gcg tta gaa aac gga gta gcg gta ttt gca aca 912

Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr

290

295

300

gag tgg gga acg agt caa gct agt gga gac ggt ggt cct tac ttt gat 960



Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp  
305 310 315 320

gaa gca gat gta tgg att gaa ttt tta aat gaa aac aac att agc tgg 1008  
Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp  
325 330 335

gct aac tgg tct tta acg aat aaa aat gaa gta tct ggt gca ttt aca 1056  
Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr  
340 345 350

cca ttc gag tta ggt aag tct aac gca acc aat ctt gac cca ggt cca 1104  
Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro  
355 360 365

gat cat gtg tgg gca cca gaa gaa tta agt ctt tct gga gaa tat gta 1152  
Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val  
370 375 380

cgt gct cgt att aaa ggt gtg aac tat gag cca atc gac cgt aca aaa 1200  
Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys  
385 390 395 400

tac acg aaa gta ctt tgg gac ttt aat gat gga acg aag caa gga ttt 1248  
Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe  
405 410 415

gga gtg aat tcg gat tct cca aat aaa gaa ctt att gca gtt gat aat 1296  
Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn

420

425

430

gaa aac aac act ttg aaa gtt tcg gga tta gat gta agt aac gat gtt 1344

Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val

435

440

445

tca gat ggc aac ttc tgg gct aat gct cgt ctt tct gcc aac ggt tgg 1392

Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp

450

455

460

gga aaa agt gtt gat att tta ggt gct gag aag ctt aca atg gat gtt 1440

Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val

465

470

475

480

att gtt gat gaa cca acg acg gta gct att gcg gcg att cca caa agt 1488

Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser

485

490

495

agt aaa agt gga tgg gca aat cca gag cgt gct gtt cga gtg aac gcg 1536

Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala

500

505

510

gaa gat ttt gtc cag caa acg gac ggt aag tat aaa gct gga tta aca 1584

Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr

515

520

525

att aca gga gaa gat gct cct aac cta aaa aat atc gct ttt cat gaa 1632

Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu

530

535

540

gaa gat aac aat atg aac aac atc att ctg ttc gtg gga act gat gca 1680  
 Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala  
 545 550 555 560

gct gac gtt att tac tta gat aac att aaa gta att gga aca gaa gtt 1728  
 Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val  
 565 570 575

gaa att cca gtt gtt cat gat cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct 1776  
 Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser  
 580 585 590

gtt ttt gaa gac ggt aca cgt caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct 1824  
 Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser  
 595 600 605

ggt gtg aaa aca gct tta aca att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg 1872  
 Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala  
 610 615 620

tta tca tgg gaa ttt gga tat cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg 1920  
 Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp  
 625 630 635 640

gca aca gct cca cgt tta gat ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt 1968  
 Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly  
 645 650 655

gag aat gat tat gta gct ttt gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca 2016  
 Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala  
 660 665 670

aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca cct act aac 2064  
 Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn  
 675 680 685

ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa 2112  
 Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu  
 690 695 700

tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa 2160  
 Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys  
 705 710 715 720

att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg tta cta cgt 2208  
 Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg  
 725 730 735

aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga 2256  
 Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg  
 740 745 750

gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act act gag ccg 2304  
 Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro  
 755 760 765

gtt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg cca cct gtc gat 2352

Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp

770

775

780

gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa 2400

Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys

785

790

795

800

gaa gca gta aaa gaa gaa aag aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca 2448

Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala

805

810

815

gtc aaa aat gag gct aag aaa aaa taa

2475

Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys

820

<210> 3

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gtgcatttac accattcgag ttagctggcg caaatcttga cccaggtcca gatc 54

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ccattcgagt tagctcacgc aaatcttgac ccag 34

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ccattcgagt tagctcgtgc aaatcttgac ccag 34

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

caataacatc cattgtaagc ttctcagcac c 31

【図面の簡単な説明】

【図 1】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の相同性を有するセルラーゼのアミノ酸配列を整列させた図である。

【図 2】

アラニン-グリシン-アラニン変異体の最適反応 p H を示す図である。

【図 3】

アラニン-ヒスチジン-アラニン変異体の最適反応 p H を示す図である。

【図 4】

アラニン-アルギニン-アラニン変異体の最適反応 p H を示す図である。

## 【書類名】

## 図面

## 【図1】

Eg1-237 1:MMLRKKTKQLISSILILVLLSLFPAALAAGNTREDNFKHLLGNDNVKRPSEAGALQLQEVGQMTLVQHGKIQLRGMSTHGLQWFP 90  
 Eg1-1139 1:MMLRKKTKQLISSILILVLLSLFPTALAAGNTREDNFKHLLGNDNVKRPSEAGALQLQEVGQMTLVQHGKIQLRGMSTHGLQWFP 90  
 Eg1-64 1:MMLRKKTKQLISSILILVLLSLFPTALAAGNTREDNFKHLLGNDNVKRPSEAGALQLQEVGQMTLVQHGKIQLRGMSTHGLQWFP 90  
 Eg1-N131b 1:MMLRKKTKQLGR-----PAQA--EGNTREDNFKHLLGNDNVKRPSEAGALQLQEVGQMTLVQHGKIQLRGMSTHGLQWFP 76  
 \*\*\*\*\*

Eg1-237 91:EILNDNAYKALSNDWDSNMIRLAMYVGNGYATNPelikQORVIDGIELAIENDMYVVDWHVHAPGDPDPVYAGAKDFPREIAALYPNN 180  
 Eg1-1139 91:EILNDNAYKALSNDWDSNMIRLAMYVGNGYATNPelikQORVIDGIELAIENDMYVVDWHVHAPGDPDPVYAGAKDFPREIAALYPNN 180  
 Eg1-64 91:EILNDNAYKALSNDWDSNMIRLAMYVGNGYATNPelikQORVIDGIELAIENDMYVVDWHVHAPGDPDPVYAGAKDFPREIAALYPNN 180  
 Eg1-N131b 77:EILNDNAYKALSNDWDSNMIRLAMYVGNGYATNPelikQORVIDGIELAIENDMYVVDWHVHAPGDPDPVYAGAKDFPREIAALYPNN 166  
 \*\*\*\*\*

Eg1-237 181:PHIYELANEPSSNNNGGAGIPNNEEGWNAKEYADPIVEMLRKSGNADDNIIIVGSPNWSQRPDLAADNPIDDHHTMYTVHFYTGSHAA 270  
 Eg1-1139 181:PHIYELANEPSSNNNGGAGIPNNEEGWNAKEYADPIVEMLRKSGNADDNIIIVGSPNWSQRPDLAADNPIDDHHTMYTVHFYTGSHAA 270  
 Eg1-64 181:PHIYELANEPSSNNNGGAGIPNNEEGWNAKEYADPIVEMLRKSGNADDNIIIVGSPNWSQRPDLAADNPIDDHHTMYTVHFYTGSHAA 270  
 Eg1-N131b 167:PHIYELANEPSSNNNGGAGIPNNEEGWNAKEYADPIVEMLRKSGNADDNIIIVGSPNWSQRPDLAADNPIDDHHTMYTVHFYTGSHAA 256  
 \*\*\*\*\*

Eg1-237 271:STESYPSETPNSEGNVMSNTRYALENGVAVFATEWGTQSAGDGGPYFDEADVWIEFLNENNISWANWSLTNKNVSGAFTPFELGKSN 360  
 Eg1-1139 271:STESYPSETPNSEGNVMSNTRYALENGVAVFATEWGTQSAGDGGPYFDEADVWIEFLNENNISWANWSLTNKNVSGAFTPFELGKSN 360  
 Eg1-64 271:STESYPSETPNSEGNVMSNTRYALENGVAVFATEWGTQSAGDGGPYFDEADVWIEFLNENNISWANWSLTNKNVSGAFTPFELGKSN 360  
 Eg1-N131b 257:STESYPSETPNSEGNVMSNTRYALENGVAVFATEWGTQSAGDGGPYFDEADVWIEFLNENNISWANWSLTNKNVSGAFTPFELGKSN 346  
 \*\*\*\*\*

Eg1-237 361:ATNLDGPDQVWVPEELSLSGEYVRARIKGVNYEPIDRTKYTKVLWDFNDGKQGPVNSDSPNKELIAVDNENNTLKVSGLDVSNVSD 450  
 Eg1-1139 361:ATSLDGPDPQVWVPEELSLSGEYVRARIKGVNYEPIDRTKYTKVLWDFNDGKQGPVNSDSPNKELIAVDNENNTLKVSGLDVSNVSD 449  
 Eg1-64 361:ATSLDGPDPQVWVPEELSLSGEYVRARIKGVNYEPIDRTKYTKVLWDFNDGKQGPVNSDSPNKELIAVDNENNTLKVSGLDVSNVSD 449  
 Eg1-N131b 347:ATSLDGPDPQVWVPEELSLSGEYVRARIKGVNYEPIDRTKYTKVLWDFNDGKQGPVNSDSPNKELIAVDNENNTLKVSGLDVSNVSD 436  
 \*\*\*\*\*

Eg1-237 451:GNFWANARLSANGWGSVDILGAELTMDVIVDEPTTVSIAAIPQSGSGWANPERAVRVNAEDFVQQTGKYKAGLTITGEDAPNLKNI 540  
 Eg1-1139 450:GNFWANARLSANGWGSVDILGAELTMDVIVDEPTTVSIAAIPQSGSGWANPERAVRVNAEDFVQQTGKYKAGLTITGEDAPNLKNI 538  
 Eg1-64 450:GNFWANARLSANGWGSVDILGAELTMDVIVDEPTTVSIAAIPQSGSGWANPERAVRVNAEDFVQQTGKYKAGLTITGEDAPNLKNI 538  
 Eg1-N131b 437:GNFWANARLSANGWGSVDILGAELTMDVIVDEPTTVSIAAIPQSGSGWANPERAVRVNAEDFVQQTGKYKAGLTITGEDAPNLKNI 526  
 \*\*\*\*\*

Eg1-237 541:APHEDNNNNIILFVGTDAADVIYLDNIKIVIGTEVEIPVVDHPKGEAVLPSVFEDGTRQGWWDWAGESGVKTALTIEEANGSNALSWEFG 630  
 Eg1-1139 539:AMHAENNNNNIILFVGTGADVIYLDNIKIVIGTEVEIPVVDHPKGEAVLPSVFEDGTRQGWWDWAGESGVKTALTIEEANGSNALSWEFG 628  
 Eg1-64 539:AMHAENNNNNIILFVGTGADVIYLDNIKIVIGTEVEIPVVDHPKGEAVLPSVFEDGTRQGWWDWAGESGVKTALTIEEANGSNALSWEFG 628  
 Eg1-N131b 527:AMHAENNNNNIILFVGTGADVIYLDNIKIVIGTEVEIPVVDHPKGEAVLPSVFEDGTRQGWWDWAGESGVKTALTIEEANGSNALSWEFG 616  
 \*\*\*\*\*

Eg1-237 631:YPEVKPSDNWATAPRLDFWKSGLVRGENDYVTFDYLDPVRATEGAMNINLVFPQPTNGYVQAPKTYTINFDELEENQVNGLYHYEVK 720  
 Eg1-1139 629:YPEVKPSDNWATAPRLDFWKSGLVRGENDYVTFDYLDPVRATEGAMNINLVFPQPTNGYVQAPKTYTINFDELEENQVNGLYHYEVK 718  
 Eg1-64 629:YPEVKPSDNWATAPRLDFWKSGLVRGENDYVTFDYLDPVRATEGAMNINLVFPQPTNGYVQAPKTYTINFDELEENQVNGLYHYEVK 718  
 Eg1-N131b 617:YPEVKPSDNWATAPRLDFWKSGLVRGENDYVTFDYLDPVRATEGAMNINLVFPQPTNGYVQAPKTYTINFDELEENQVNGLYHYEVK 706  
 \*\*\*\*\*

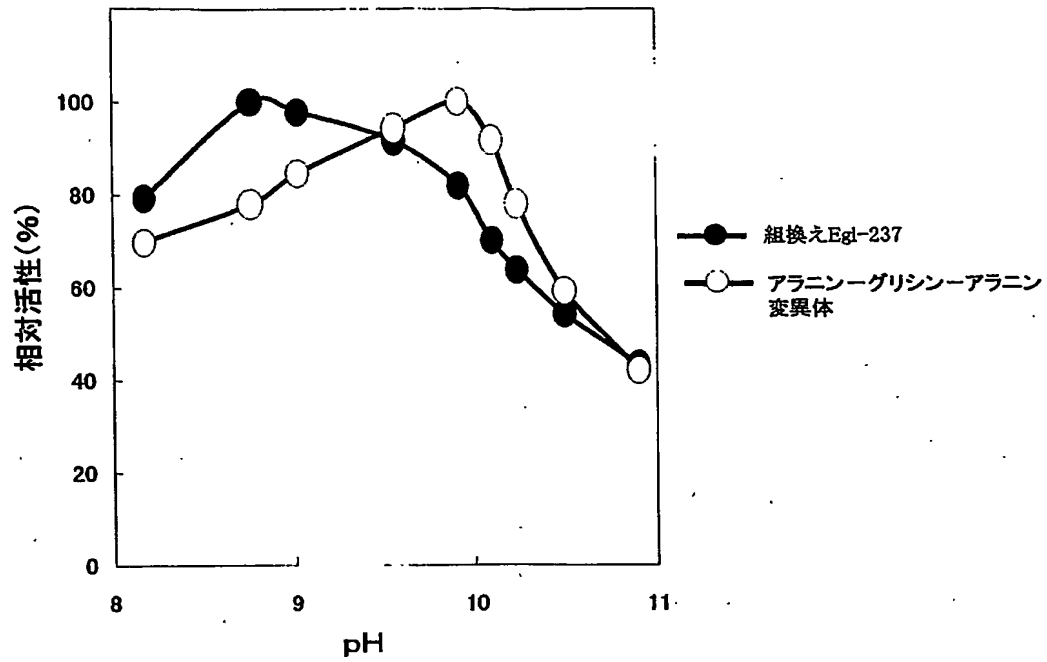
Eg1-237 721:INVRDITNIQDDTLRNMIIIFADVESDFAGRVFVDNVRFEAGATTEPVEPEFVDPGEETPPVDEKEAKKEQKEAEKEEKAUKEEKEA 810  
 Eg1-1139 719:INVRDITNIQDDTLRNMIIIFADVESDFAGRVFVDNVRFEAGATTEPVEPEFVDPGEETPPVDEKEAKKEQKEAEKEEKEE----- 800  
 Eg1-64 719:INVRDITNIQDDTLRNMIIIFADVESDFAGRVFVDNVRFEAGATTEPVEPEFVDPGEETPPVDEKEAKKEQKEAEKEEKAUKEEKEA 808  
 Eg1-N131b 707:INVRDITNIQDDTLRNMIIIFADVESDFAGRVFVDNVRFEAGATTEPVEPEFVDPGEETPPVDEKEAKKEQKEAEKEEKAUKEEKEA 796  
 \*\*\*\*\*

Eg1-237 811:KEEKAUKEEAKKK 824  
 Eg1-1139 801:----- 801  
 Eg1-64 809:KEEKAUKEEAKKK 822  
 Eg1-N131b 797:KEEKAUKEEAKKK 810  
 \*\*\*\*\*

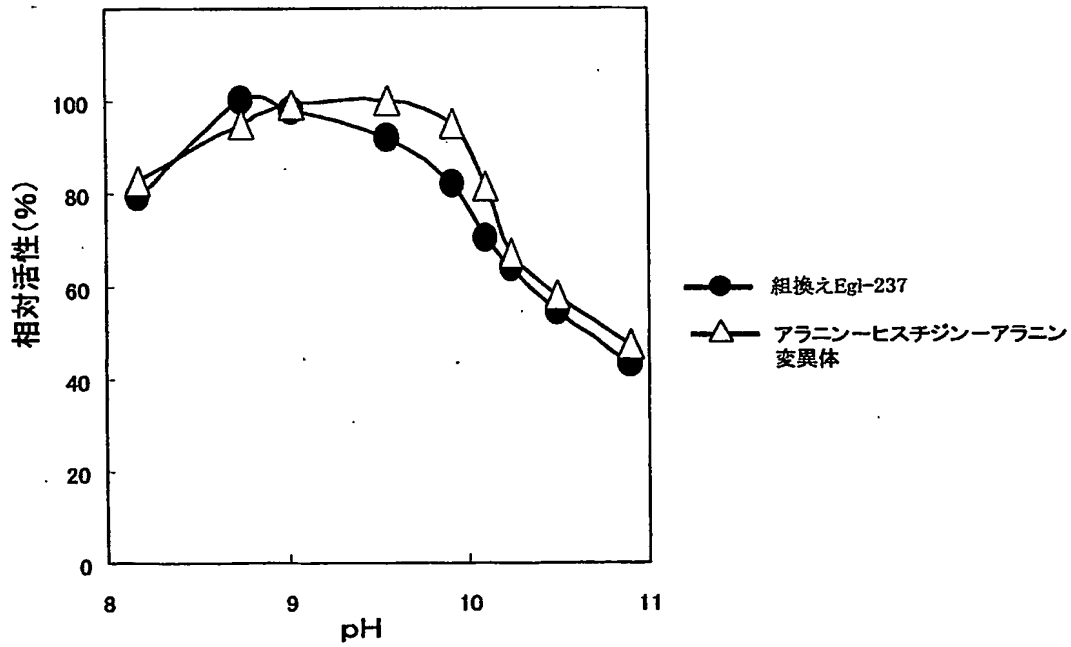
BEST AVAILABLE COPY



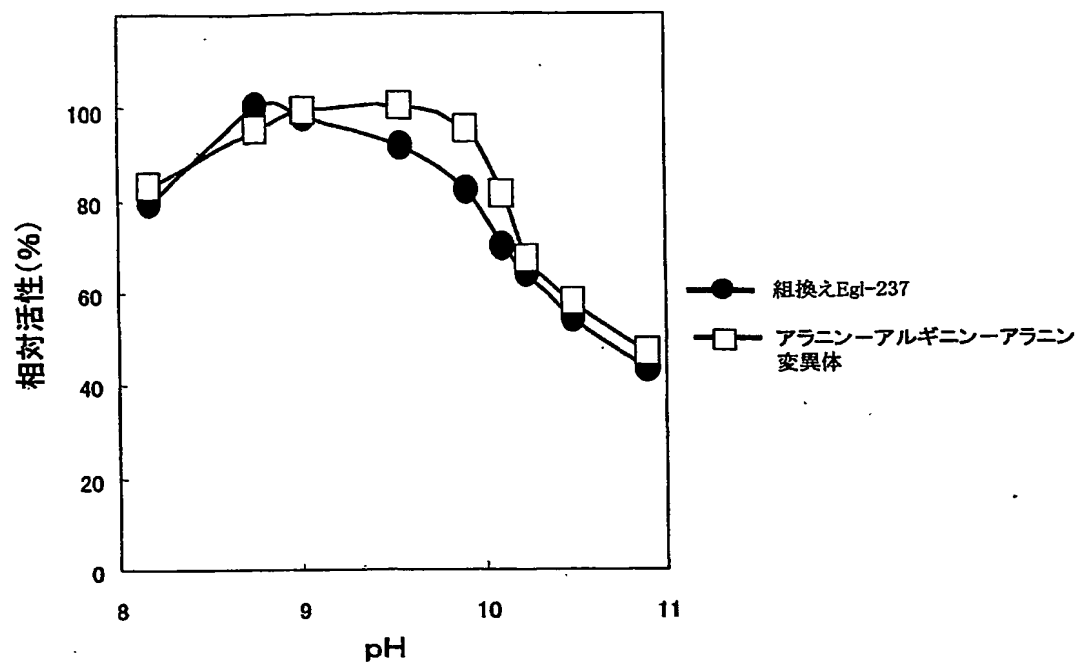
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列又はこれと 9 0 % 以上の相同性を有するセルラーゼについて、配列番号 1 の 3 4 3 位～3 7 7 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基から選ばれる 1 以上を欠失させ、当該欠失部分にアミノ酸残基数 2 ～1 5 のペプチド残基を挿入した変異アルカリセルラーゼ；これをコードする遺伝子。

【効果】 本発明の変異アルカリセルラーゼは、洗濯液中の p H ( p H 1 0 . 5 付近) に近い最適 p H を有し、洗剤用酵素として有用である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-124474
受付番号	50200611172
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 4月26日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 4月25日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000918]

1. 変更年月日	1990年 8月24日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
氏 名	花王株式会社